

Machine translation JP2000139468

(19) **Publication country** Japan Patent Office (JP)
(12) **Kind of official gazette** Open patent official report (A)
(11) **Publication No.** JP,2000-139468,A (P2000-139468A)
(43) **Date of Publication** May 23, Heisei 12 (2000. 5.23)
(54) **Title of the Invention** The proteinic manufacture approach that labeling of the C terminal was carried out
(51) **The 7th edition of International Patent Classification**

C12N 15/09 ZNA

C07K 1/13

C12P 21/00

FI

C12N 15/00 ZNA A

C07K 1/13

C12P 21/00 C

Request for Examination Un-asking.

The number of claims 7

Mode of Application OL

Number of Pages 9

(21) **Application number** Japanese Patent Application No. 10-320093

(22) **Filing date** November 11, Heisei 10 (1998. 11.11)

(71) **Applicant**

Identification Number 000005968

Name Mitsubishi Chemical, Inc.

Address 2-5-2, Marunouchi, Chiyoda-ku, Tokyo

(72) **Inventor(s)**

Name Yanagawa Hiroshi

Address 11, Minami-Oya, Machida-shi, Tokyo Inside of Mitsubishi Chemical Life-science Lab

(72) **Inventor(s)**

Name Origin Direct people

Address 11, Minami-Oya, Machida-shi, Tokyo Inside of Mitsubishi Chemical Life-science Lab

(74) **Attorney**

Identification Number 100103997

Patent Attorney

Name Hasegawa ****

Theme code (reference)

4B024

4B064

4H045

F term (reference)

4B024 AA11 AA20 BA80 CA01 CA02 CA04 CA11 CA12 CA20 DA01 DA02 DA05 DA11
GA11 GA17 GA18 GA19

4B064 AG01 CA01 CA19 CA50 CC01 CC24 CD30 CE14 DA13

4H045 AA20 BA54 BA70 BA71 EA50 EA65 FA74

(57) **Abstract**

Technical problem Offer of the approach of carrying out labeling of the proteinic C terminal efficiently with a labeling reagent.

BEST AVAILABLE COPY

Means for Solution Protein synthesis is performed by the acellular translation system or the viable cell system by using as mold the product imprinted from DNA which consists of a coding region which is under control of promoterregion under existence of the labeling reagent which consists of the label section which consists of a marker, and the acceptor section which consists of a compound which has the capacity combined with a proteinic C terminal, and where the termination codon was deleted.

Effect A means very effective **the C terminal labeling method of protein with the labeling reagent of this invention is effective in the proteinic detection and the identification which discovers by various acellular translation systems and viable cells, and** when increasing the efficiency of and automating the proteinic identification which held the function correspond, in the functional analysis of the gene accumulated in genome analysis, and the functional analysis of protein especially like a nucleic-acid-protein interaction or a protein-protein interaction offers.

Claim(s)

Claim 1 the proteinic manufacture approach characterize by to make protein synthesis perform in an acellular translation system or a viable cell by use as mold the product imprinted from the DNA which consist of a coding region which be under control of promoterregion under existence of the labeling reagent which consist of the label section which consist of a marker , and the acceptor section which consist of a compound which have the capacity combine with a proteinic C terminal , and where a termination codon be deleted that the labeling of the C terminal be carried out .

Claim 2 The approach according to claim 1 of being DNA which a coding region becomes from the die length corresponding to 50-3,000 amino acid residue.

Claim 3 The approach according to claim 1 the label section of a labeling reagent is the fluorescence matter, the radioactive substance, or a nonradioactive marker.

Claim 4 The approach according to claim 1 the acceptor section of a labeling reagent is a nucleic acid or a nucleic-acid derivative.

Claim 5 a nucleic-acid derivative -- a nucleic acid and amino acid -- the approach according to claim 4 of being the compound which the amino acid derivative combined youthfully.

Claim 6 The approach according to claim 4 or 5 a nucleic-acid derivative is puromycin or a puromycin derivative.

Claim 7 The approach according to claim 1 an acellular translation system uses a wheat germ extract or a rabbit reticulocyte lysate.

Detailed Description of the Invention

0001

Field of the Invention This invention relates to the approach of carrying out labeling of the proteinic C terminal efficiently with a labeling reagent. A means very effective **the C terminal labeling method of protein with the labeling reagent of this invention is effective in the proteinic detection and the identification which discovers by various acellular translation systems and viable cells, and** when increasing the efficiency of and automating the proteinic identification which held the function correspond, in the functional analysis of the gene accumulated in genome analysis, and the functional analysis of protein especially like a nucleic-acid-protein interaction or a protein-protein interaction

offers.

0002

Description of the Prior Art The radioactivity label-ized method make a translation product incorporate the amino acid which carried out the label by activity elements, such as ^{35}S , ^3H , and ^{14}C , is common to the labeling of the protein made to discover by the acellular translation system or the viable cell. In this case, in order to use activity, a special facility etc. is needed on safety management. For this reason, the approach of carrying out the following as an approach which does not use a radioactive compound is learned. According to this approach, what carried out covalent bond of the biotin to epsilon-amino group of the lysine of amino acid, and carried out the ester bond of this to tRNA with the anticodon of a lysine first (biotin-lysine-tRNA) is compounded, it supplies to an acellular translation system, and a translation product is biotin-ized. A translation product is moved to a membrane after electrophoresis, and carries out chemiluminescence of the translation product by alkaline phosphatase with the fusion protein of alkaline phosphatase and streptoavidin. A translation product is identified for this using an X-ray film etc. (Promega (1993), Technical Bulletin, No.182, p2). Compound biotin-lysine-tRNA is instability (it is six months at -70°C) very much, and this approach has the fault of being expensive. Furthermore, the trouble of it being complicated and taking time amount also has the formula to identification. Therefore, this approach is very disadvantageous for automation for a lot of sample processing. Furthermore, since, as for the translated protein, two or more lysine side chains are embellished with the biotin, a function and structure may be changing with the original thing.

0003

Problem(s) to be Solved by the Invention the labeling of translation protein in / in the technical problem of this invention / an acellular translation system and a viable cell -- setting -- 1 -- efficient 2 -- simple 2 -- it is in offering the manufacture approach of the protein which fulfilled the conditions that 3 economical labeling reagents are stability for a long period of time and that the function of four translation products and structure were not influenced, such as five safeties, and with which labeling of the C terminal was carried out.

0004

Means for Solving the Problem The label section which consists of a marker as a result of inquiring wholeheartedly that this invention person etc. should solve the above-mentioned technical problem, Under existence of the labeling reagent which consists of the acceptor sections which consist of a compound which has the capacity combined with a proteinic C terminal, If protein synthesis is made to perform in an acellular translation system or a viable cell by using as mold the product imprinted from DNA which consists of a coding region under control of promoterregion where the termination codon was deleted It came to complete header this invention for labeling of the C terminal of the protein of the amount of giant molecules being carried out efficiently, without spoiling the function of a proteinic C terminal. Namely, under existence of the labeling reagent which consists of the label section which this invention becomes from (1) marker, and the acceptor section which consists of a compound which has the capacity combined with a proteinic C terminal, Consist of making protein synthesis perform in an acellular translation system or a viable cell system by using as mold the product imprinted from DNA which consists of a coding region under control of promoterregion where the termination codon was deleted. The proteinic manufacture approach that labeling of the C terminal was carried out, an approach given in the 1st term it is **term** DNA which (2) coding regions become from the die length corresponding to 50-3,000 amino acid residue, (3) An approach given in the 1st term whose label section of a labeling reagent is the fluorescence matter, the radioactive substance,

or a nonradioactive marker, (4) An approach given in the 1st term whose acceptor section of a labeling reagent is a nucleic acid or a nucleic-acid derivative, (5) -- a nucleic-acid derivative -- a nucleic acid and amino acid -- an approach given in the 4th term which is the compound which the amino acid derivative combined youthfully -- (6) It consists in an approach given in 4 or 5 term whose nucleotide derivative is puromycin or a puromycin derivative, and an approach given in the 1st term to which a (7) acellular translation system uses a wheat germ extract or a rabbit reticulocyte lysate. The description of this invention is in an acellular translation system or a viable cell system under control of promoterregion. The product (processing mRNA) imprinted from DNA which consists of a coding region where the termination codon was deleted is added as mold. If protein synthesis is made to perform under existence of labeling reagents, such as puromycin with a last concentration **M** of 15-50micro or a puromycin derivative The quality of a label ghost combines with the C terminal of translation protein efficiently, and it is in the protein of the amount of macromolecules with which labeling of the C terminal was carried out being obtained. The compound which carried out the chemical bond of the fluorescent materials, such as a fluorescein, to puromycin was understood that proteinic identification is possible, without using the activity matter, in order to combine with the C terminal of translation protein like puromycin, without spoiling the function of a proteinic C terminal. That is, translation protein can be easily identified by adding labeling reagents, such as fluorescence-ized puromycin, to an acellular translation system, carrying out electrophoresis of the resultant after a reaction, and reading gel with a fluorescence image analyzer as it is.

0005

Embodiment of the Invention The protein with which labeling of the C terminal of the protein of this invention was carried out adds the transcript (processing mRNA) of processed DNA to an acellular translation system or a viable cell system as mold, and is manufactured by making protein synthesis perform under existence of the labeling reagent which consists of the label section which consists of a marker, and the acceptor section which consists of a compound which has the capacity combined with a proteinic C terminal.

0006 The product (processed mRNA) imprinted from DNA which consists of a coding region under control of promoterregion where the termination codon was deleted is acquired by imprinting using RNA polymerase from DNA which consists of promoterregion and a coding region where the termination codon was deleted. As for the die length of a coding region, it is desirable that it is DNA of the die length corresponding to 50-3,000 amino acid residue. That is, since according to the approach of this invention the labeling of the C terminal can be efficiently carried out even if it is protein of the amount of giant molecules, it is very useful to identification and its functional analysis of the protein obtained in genome analysis.

0007 By the approach of this invention, labeling of the proteinic C terminal is carried out with a labeling reagent. A labeling reagent consists of the label section and the acceptor section. The label section is usually chosen from the fluorescence matter, the radioactive substance, and a nonradioactive marker. As a fluorescent material of the label section, it may have functional groups (for example, a carboxyl group, a hydroxyl group, amino group, etc.) free besides a fluorescein sequence, and as long as it is the various fluorochromes (for example, a rhodamine sequence, an eosine sequence, a NBD sequence, etc.) which can be connected with nucleotide derivatives, such as puromycin or a puromycin Mr. compound, through a spacer, you may be what kind of thing.

0008 In addition, if it is the compound in which nonradioactive markers, such as a radioactive marker like ³³P, ³²P, and ³⁵S, a coenzyme like a biotin, protein, a peptide, a saccharide, lipids, coloring matter, and a polyethylene glycol, or labeling is possible as the label section, the class of the compound and magnitude will not

be asked.

0009 As the acceptor section which is another component which constitutes a labeling reagent, a nucleic acid or a nucleic-acid derivative is usually used. The compound which the matter which has a chemical structure frame similar to a nucleic acid, amino acid, or amino acid as a nucleic-acid derivative combined chemically can be used. As a typical compound, the puromycin (Puromycin) which has amide association, and a 3'-N-aminoacyl puromycin amino nucleoside (3'-N-Aminoacylpuromycin aminonucleoside, PANS-amino acid), for example, the PANS-all amino acid compound corresponding to PANS-Gly of a glycine, PANS-Val of a valine, PANS-Ala of an alanine, and all other amino acid in the amino acid section, are mentioned. Moreover, a 3'3connected in amide association formed as a result of amino-group of - amino adenosine and carboxyl group of amino acid carrying out dehydration condensation'-N-aminoacyl adenosine amino nucleoside (3'-Aminoacyladenosine aminonucleoside, AANS-amino acid), for example, the AANS-all amino acid compound corresponding to AANS-Gly of a glycine, AANS-Val of a valine, AANS-Ala of an alanine, and all other amino acid in the amino acid section, can be used as a chemical bond. Moreover, that in which a nucleoside or a nucleotide, and amino acid carried out the ester bond can be used. In addition, the matter which has a chemical structure frame and a base similar to a nucleic acid or a nucleic acid, and the matter which has a chemical structure frame similar to amino acid can be used for all the compounds that made such and were combined if association is chemically possible.

0010 The above-mentioned puromycin (compound of Fig. 1 I) is bacteria ().

Nathans, D.Proc(1964).Natl.Acad.Sci.USA, 51,585-592; Takeda, Y.et al.(1960) J. Biochem.48,169-177 and animal cell () Ferguson, J.J.(1962)

Biochim.Biophys.Acta 57,616-617; Nemeth, A.M.& de Checking the protein synthesis of la Haba, G.L.J(1962).Biol.Chem.237, and 1190-1193 is known. Since the structure of puromycin is similar with the structure of aminoacyl tRNA, it goes into A site on ribosome, reacts with the peptidyl tRNA which exists in P site, and is isolated from ribosome as peptidyl puromycin (Harris, R.J.Biochim(1971).Biophys.Acta 240, 244-262).

0011 In the protein synthesis system, when cut mRNA without a termination codon is used for mold, it is known that protein synthesis will stop. Thus, when there is no codon corresponding to mRNA, even if aminoacyl-tRNA and a termination factor go into A site on ribosome, the catalyst of them is not carried out by transpeptidation. On the other hand, it turned out also in such the condition that the catalyst of the derivative of puromycin or this invention is carried out by the transpeptidation of ribosome to A site on ribosome, and it can combine with a proteinic C terminal efficiently.

0012 In order to confirm this, it is necessary to create mRNA with a termination codon, and mRNA without a termination codon, and to investigate the effectiveness of the fluorescence labeling of a proteinic C terminal with the puromycin derivative of fluorescence, for example, full ORESE nil puromycin, (Fluorpur) (compound of II of drawing 1) in addition to an acellular translation system.

0013 what does not have T7 promotor from 5' side as shown in drawing 2 , a Kozak array (Cossack array), the coding region of a beta lactamase, and it and a termination codon in order to prepare mRNA of a thing without the termination codon of a beta lactamase (molecular weight 32 kDa) with molecular weight standard as protein, and a certain thing (A) -- a certain thing (B) Gene DNA was created.

0014 As a puromycin derivative of fluorescence, puromycin was chosen as a fluorescein and the acceptor section as the label section, and chemosynthesis of the labeling compound of the fluorescence which connected both by the chemical bond, for example, the Fluorpur, (compound of II of Fig. 1) was carried out.

0015 In the acellular linked transcription translation of eukaryote, for example, the translation system of a rabbit reticulocyte lysate (Nuclease treated Rabbit reticulocyte lysate) or a wheat germ extract The T7 above-mentioned promotor, a Kozak array, the coding region of a beta lactamase, If add the transcript (processing mRNA) from DNA of it, a thing without a termination codon, and a certain thing as mold, protein synthesis is made to perform under Fluorpur existence and it investigates about proteinic fluorescence labeling It turned out that Fluorpur has combined with the C terminal of the overall-length protein of a beta lactamase clearly by the concentration of 16microM (drawing 3 A). Fluorpur As for the fluorescence labeling of the overall-length protein of a beta lactamase to twist, the acellular linked transcription translation of Escherichia coli was also checked. When the acellular translation system of a wheat germ extract was used especially, compared with mRNA (lane 3 of drawing 3) in which a termination codon has the direction (lane 1 of drawing 3) of mRNA without a termination codon, it was checked that labeling effectiveness increases by about 10 times.

0016

Example Although an example explains this invention still more concretely below, the following example should not be wholly made an aid which acquires the concrete recognition about this invention, and the range of this invention is not limited at all by the following example.

0017 Construction of DNA for C-terminal fluorescence labeling <1> imprint of a beta lactamase and the creation ingredient of mRNA using the acellular translation system (a wheat-germ extract, rabbit reticulocyte lysate) of example 1 eukaryotic cell: pBR322 plasmid (Sutcliffe, J.G.(1978) Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 75, 3737-3741) in which the beta lactamase gene appeared was supplied by Mr. Masamichi Ishizaka (Kyushu University, the Mitsubishi Chemical life-science lab). E. DNA including T7 promotor and Kozak consensus sequence of a coli pAR vector (Rosenberg and A.H.et.al.(1987) Gene 56,125-135) was compounded in Nippon Flour Mills Co., Ltd. S peck oligo service, and DNA/RNA primer were compounded for the DNA primer for PCR with a Japanese JIEN set, respectively. Various enzymes, a reagent, etc. are :ribonuclease Ribonuclease A which used the commercial thing. (sigma); nucleic-acid repair enzyme T-four DNA Polynucleotide Kinase (NEB), T-four DNA ligase (NEB) ; heat-resistant DNA synthetase Gold Taq. Polymerase (Perkin-Elmer) ; RNA synthetase kit Ribomax Large Scale RNA Production System (Promega); cap analog RNA capping Analog (Gibco BRL); -- acellular translation system kit: -- rabbit reticulocyte lysate (Rabbit Reticulocyte Lysate Systems, Nuclease Treated, Promega) wheat germ extract (Wheat Germ Extract, Promega) ; electrophoresis reagent All of acrylamide, an acrylamide screw, SDS, etc. are the Nakarai Tesuku make. Primer remover Primer Remover It purchased from Edge.

0018 Approach: DNA (drawing 2) with the DNA array (T7 promotor array) recognized by the RNA polymerase of the Escherichia coli virus T7 with high imprint effectiveness and the array (Kozak consensus sequence) which tends to be recognized by the ribosome of an eukaryotic cell in the case of a translation was built as follows. First, a field with the above-mentioned array and a field with a beta lactamase gene are created independently. Chemosynthesis of the single stranded DNA (array number 1) including T7 promotor array and a Kozak consensus sequence is carried out, and a DNA primer (array number 2), and DNA/RNA primer (array number 3) perform PCR. They are DNA/RNA primer (array number 4), using as mold pBR322 plasmid in which the beta lactamase gene appeared on the other hand. A beta lactamase gene DNA field is amplified by carrying out PCR by the DNA primer (array number 5). The RRR method (Nishigaki, K.et al.(1995) Chem.lett.131-132) is followed in these, and it is RNase to each PCR reaction mixture. By adding A and making it react at 60 degrees C for 30 minutes, the phosphodiester bond by the side of 3' of RNA of DNA/RNA primer (the array

number 3 and array number 4) is cut, and a cohesive end is made. After a phenol extract, with a primer remover (Primer Remover), a primer and the cut DNA fragment are removed and ethanol precipitate of these is carried out. after desiccation and T-four DNA the buffer for ligases -- dissolving -- T-four DNA a polynucleotide kinase (Polynucleotide Kinase) -- adding -- after 45 degrees C and a 30-minute reaction -- further -- since temperature is gradually lowered to 16 degrees C over 30 minutes -- T-four DNA The ligase was added and two above-mentioned DNA fields were combined. a part of this reaction mixture is extracted -- using the DNA primer (the array number 2 and array number 5), again, it amplified by PCR and (A) of drawing 2 was created to the imprint.

0019 DNA for an imprint (B of drawing 2) which consists of a beta lactamase gene with a termination codon on the other hand was created by using another DNA primer (array number 6) instead of a DNA primer (array number 5) in the above-mentioned approach. Two DNA created by the above-mentioned approach is RNA-biosynthesis kits. It imprinted using Ribomax Large Scale RNAProduction System (Promega). It is a cap analog in order to gather combined efficiency. RNA capping Analog (Gibco BRL) was used and 5' side of mRNA was embellished. In order to remove a cap analog and superfluous NTP, ethanol precipitate was performed using the primer remover.

0020 The preparation ingredient of <2> fluorescence level-ized reagent Fluorpur: Full OREDAITO (6-N-carboxy-di-O-pivaloyl-fluorescein-hexyl-O-(2-cyanoethyl)-(N and N'-diisopropyl)-phosphoramidite) purchased puromycin (puromycin), and Japanese par SEPUTIBU to tetrazole purchased Nihon Millipore to the silica gel for chromatography from Merck from the sigma, respectively.

0021 Approach: Melt puromycin (26 mg, 48 mumol) to the desiccation pyridine of 3 ml, make it evaporate under reduced pressure, and make it dehydrate. This actuation is repeated 3 times. 4% tetrazole / acetonitrile solution, and full OREDAITO of 5 ml are added to this, and it is made to agitate at a room temperature. It acts as the monitor of the reaction with the thin-layer chromatography (TLC, an expansion solvent:chloroform:methanol = 9:1) of silica gel. Usually, a reaction is ended in 2 hours. Solution which *****ed under reduced pressure of a solvent after the reaction, and melted the iodine of 0.1 M to this a tetrahydrofuran / pyridine / water =80:40:2 2 ml is added and the phosphite-triester generated while making it agitate at a room temperature is oxidized. It removes under reduced pressure of a solvent after 1 hour and a half, and the remainder is extracted by chloroform. An extract removes a solvent under reduced pressure, after making it dry under sulfuric anhydride magnesium existence. This is applied to a silica gel column chromatography, and elution is carried out by chloroform / methanol =90:10. Elution of the Fluorpur which the protective group attached is carried out at the place of Rf 0.26 with silica gel TLC (chloroform: expansion solvent : methanol = 9:1). Next, deprotection of a protective group is performed. Fluorpur which the protective group attached -- dark -- mixed solution of aqueous ammonia / ethanol =2:1 1 ml In addition, removal of beta-cyano ethyl group obtains 7mg (II of drawing 1 R> 1) of Fluorpur(s). That synthetic compounds are Fluorpur, the molecular ion of $M+H^+$ was identified that the ultraviolet and visible absorption spectrum of the solution of pH 9 appears in 272 nm (puromycin section origin) and 494 nm (fluorescein section origin) from appearing in m/z 1010 by MALDI/TOF mass spectrometry.

0022 mRNA in which <3> protein carried out fluorescence labeling creation was made to react in addition for 60 minutes with each optimum reaction temperature (rabbit reticulocyte acellular translation system; 30 degrees C, wheat germ acellular translation system;25 degree C) so that the last concentration of Fluorpur may be set to 16microM in (1) rabbit reticulocyte acellular translation system Rabbit ReticulocyteLysate Systems, Nuclease Treated, and (Promega) two kinds of

translation systems of (2) wheat-germ acellular translation system Wheat Germ Extract (Promega).

0023 the proteinic check by which labeling was carried out by the check full ORESE nil puromycin (Fluorpur) of the labeling of <4> protein -- the above-mentioned acellular translation product -- a sample -- carrying out -- SDS-PAGE -- 20 -- it carried out by reading directly the gel which migrated for 90 minutes with a fluorescence imaging instrument (FluorImager 595, Molecular Dynamics) V constant voltage. Using the wheat germ system acellular translation system, using mRNA imprinted from DNA (A of drawing 2) without a termination codon, the overall-length beta lactamase (molecular weight 32kDa) by which the fluorescence label was carried out most efficiently was obtained, when it added so that Fluorpur may become the last concentration M of 16micro (lane 1 of drawing 3 A). however, the same wheat germ system acellular translation system is used -- even if Fluorpur was last concentration 16microM, when mRNA imprinted from DNA (B of drawing 2) with a termination codon was used, the effectiveness of the fluorescence labeling was 1/10 or less compared with the case of DNA without a termination codon (lane 3 of drawing 3 B). Moreover, also in the acellular translation system of rabbit reticulocyte, labeling effectiveness rose three to 4 times compared with the case (lane 6 of drawing 3 A) where mRNA imprinted from DNA with a termination codon is used, by the system (lane 5 of drawing 3 A) made to translate using mRNA imprinted from DNA without a termination codon. What dyed the same gel with the fluorescence stain (SYPRO Orange) of conventional protein is shown in drawing 3 B for the comparison. When it dyed by SYPRO Orange, the protein (beta lactamase) translated by supplied mRNA was buried into the protein of the acellular translation system origin, and was not able to be checked. From the above thing, it was checked that the labeling of the protein by the approach of this invention is effective in identification of the synthetic protein by SDS-PAGE.

0024

Effect of the Invention It became possible to carry out labeling of the C terminal of the protein in which translation composition was carried out regardless of the prokaryotic cell and the eukaryotic cell by this invention using the acellular translation system and the viable cell according to fluorescence etc. efficiently. This invention makes it possible insurance and to carry out economically for identification of the protein discovered from a gene, and functional analyses, such as those interactions, more quickly. or **in addition, / combining with this protein the protein with which labeling of the C terminal obtained by the approach of this invention was carried out** -- or it is useful also to identification of the compound which interacts, and checks or activates the activity. That is, this compound can also be identified by the approach of detecting the C terminal label of this protein that disappears **which disappears and, and remains . of having joined together thru/or interacted with the compound with which the C terminal obtained by the approach of this invention tends to screen the protein by which labeling was carried out**

Layout Table

SEQUENCE-LISTING <110> Mitsubishi Chemical-Corporation <120> A process for the production of C-terminal-labelled protein <130> <140> <141> 1988-11-<160> 6 <170> PatentIn Ver.2.0 <210> 1 <211> 88 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA <400> 1 gatccgcgca aattaatacg actcactata gggagaccac aacggttcc cttagaaat 60 aatttggtt aacttaaga aggagatg 88 <210> 2 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA <400> 2 gatccgcgca aattaatacg actcactata ggg 33 <210> 3 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA <220>

<221> misc_feature <222> (6) <223> n is ribocytidylic acid. <400> 3
ggaagncatg-gtggcatctc-cttcttaa 29 <210> 4 <211> 29 <212> DNA <213>
Artificial Sequence <220> <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
<221> misc_feature <222> (6) <223> n is ribocytidylic acid. <400> 4 gcttcnaaac
aaagcactat tgactggc 29 <210> 5 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA <400> 5
ccaatgctta atcagtggagg cacctatctc a 31 <210> 6 <211> 32<212> DNA <213>
Artificial Sequence <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA <400>
6 ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg ag 32 **Array table free text**
Array number 1-6: Synthetic DNA

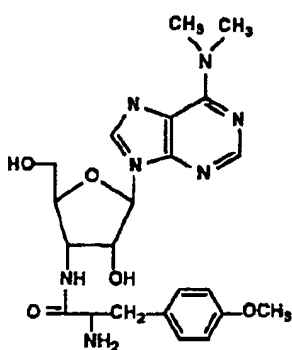
Brief Description of the Drawings

Drawing 1 Puromycin and the chemical structure of the derivative. I is puromycin (puromycin) and II is full ORESE nil puromycin (Fluorpur).

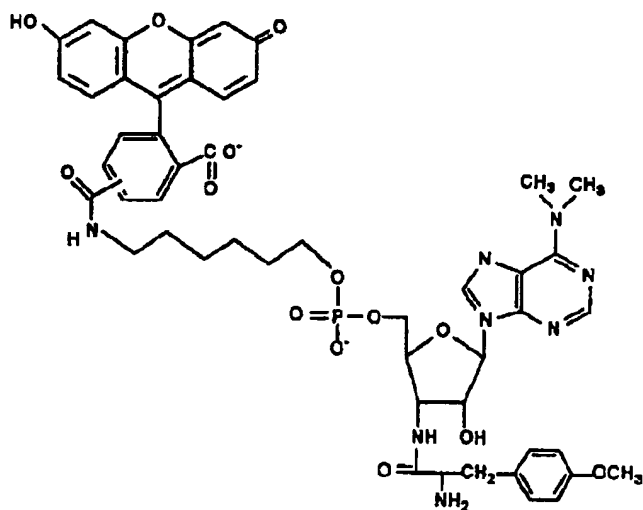
Drawing 2 The construction Fig. of the gene DNA of a beta lactamase. gene DNA in which the genes DNA and B in which A does not have a termination codon have a termination codon it is .

Drawing 3 The polyacrylamide-gel-electrophoresis photograph which carried out fluorescent staining of it to the polyacrylamide-gel-electrophoresis photograph (A) in which association of Fluorpur to the C terminal of a beta lactamase is shown by SYPRO Orange (B).

Drawing 1



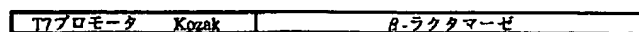
ピューロマイシン (puromycin, I)



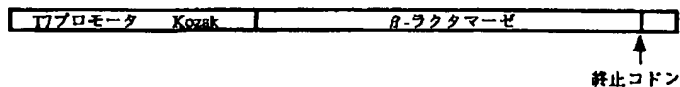
フルオレセニルピューロマイシン (Fluorpur, II)

Drawing 2

(A)

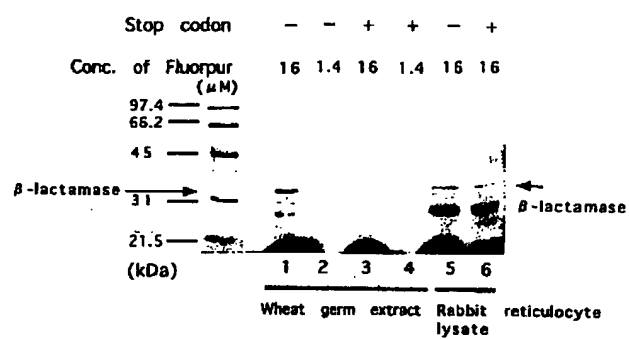


(B)

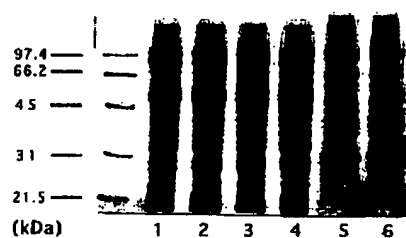


Drawing 3

(A)



(B)



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-139468

(P2000-139468A)

(43)公開日 平成12年5月23日 (2000.5.23)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 1/13		C 0 7 K 1/13	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/00		C 1 2 P 21/00	C 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数7 OL (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平10-320093

(22)出願日 平成10年11月11日 (1998. 11. 11)

(71)出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 柳川 弘志

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化学
学生命科学研究所内

(72)発明者 根本 直人

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化学
学生命科学研究所内

(74)代理人 100103997

弁理士 長谷川 曉司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C末端がラベル化されたタンパク質の製造方法

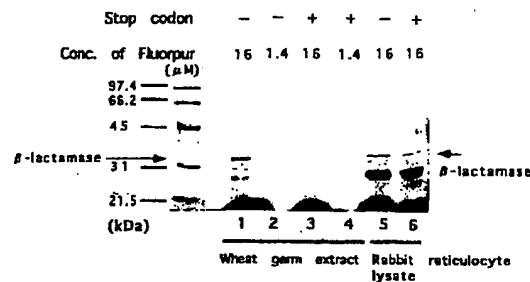
(57)【要約】

【課題】タンパク質のC末端をラベル化試薬により効率的にラベル化する方法の提供。

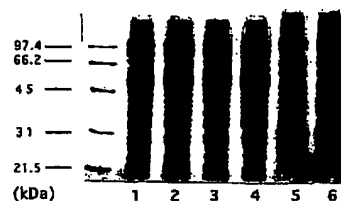
【解決手段】標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、終止コドンが削除されたコーディング領域からなるDNAから転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞系でタンパク質合成を行う。

【効果】本発明のラベル化試薬によるタンパク質のC末端ラベル化法は、種々の無細胞翻訳系や生細胞で発現するタンパク質の検出および同定に有効であり、ゲノム解析によって集積する遺伝子の機能解析において、対応する機能を保持したタンパク質の同定、特に核酸-タンパク質相互作用やタンパク質-タンパク質相互作用のようなタンパク質の機能解析を効率化、自動化する上で極めて有効な手段を提供する。

(A)



(B)



【特許請求の範囲】

【請求項1】 標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、終止コドンが削除されたコーディング領域からなるDNAから転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞中でタンパク質合成を行わせることを特徴とする、C末端がラベル化されたタンパク質の製造方法。

【請求項2】 コーディング領域が50-3,000アミノ酸残基に対応する長さからなるDNAである請求項1に記載の方法。

【請求項3】 ラベル化試薬のラベル部が、蛍光性物質、放射性物質、または非放射性標識物質である請求項1に記載の方法。

【請求項4】 ラベル化試薬のアクセプター部が、核酸または核酸誘導体である請求項1に記載の方法。

【請求項5】 核酸誘導体が、核酸とアミノ酸若しくはアミノ酸誘導体とが結合した化合物である請求項4に記載の方法。

【請求項6】 核酸誘導体が、ビュロマイシンまたはビュロマイシン誘導体である請求項4または5に記載の方法。

【請求項7】 無細胞翻訳系が小麦胚芽抽出液またはウサギ網状赤血球抽出液を使用する請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、タンパク質のC末端をラベル化試薬により効率的にラベル化する方法に関する。本発明のラベル化試薬によるタンパク質のC末端ラベル化法は、種々の無細胞翻訳系や生細胞で発現するタンパク質の検出および同定に有効であり、ゲノム解析によって集積する遺伝子の機能解析において、対応する機能を保持したタンパク質の同定、特に核酸-タンパク質相互作用やタンパク質-タンパク質相互作用のようなタンパク質の機能解析を効率化、自動化する上で極めて有効な手段を提供する。

【0002】

【従来の技術】 無細胞翻訳系や生細胞で発現させたタンパク質のラベル化には、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{14}C といった放射能元素でラベルしたアミノ酸を翻訳産物に取り込ませる放射能ラベル化法が一般的である。この場合、放射能を利用するため安全管理上、特別な施設等が必要とされる。このため、放射性化合物を使用しない方法として下記する方法が知られている。この方法によれば、まず、アミノ酸のリジンのε-アミノ基にピオチンを共有結合させ、これをリジンのアンチコドンをもつtRNAにエステル結合させたもの（ピオチン-リジン-tRNA）を合成し、無細胞翻訳系に投入し、翻訳産物をピオチン化する。翻訳産物は、電気泳動後、メンブレンに移し、アルカリフォス

ファターゼとストレプトアビジンの融合タンパク質によって、翻訳産物をアルカリフォスファターゼにより化学発光させる。これを、X線フィルム等を使って、翻訳産物を同定する（Promega社、（1993）Technical Bulletin, No.182, p2）。この方法は、合成したピオチン-リジン-tRNAが極めて不安定（ -70°C で6ヵ月）であり、高価であるという欠点を有する。さらに、同定までの処方が繁雑で時間がかかるという問題点もある。したがって、この方法は、大量の試料処理のための自動化には極めて不利である。さらに、翻訳されたタンパク質は、複数のリジン側鎖がピオチンで修飾されているために、機能および構造が本来のものと変化している可能性がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、無細胞翻訳系および生細胞における翻訳タンパク質のラベル化において、1) 効率的である、2) 簡便である、2) 経済的である、3) ラベル化試薬が長期間安定である、4) 翻訳産物の機能、構造が影響を受けない、5) 安全性などの条件を満たした、C末端がラベル化されたタンパク質の製造方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、終止コドンが削除されたコーディング領域からなるDNAから転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞中でタンパク質合成を行わせると、タンパク質のC末端の機能を損なうことなく高分子量のタンパク質のC末端が効率的にラベル化されることを見出し本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、（1）標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下、プロモーター領域の制御下にある、終止コドンが削除されたコーディング領域からなるDNAから転写された産物を鋳型として無細胞翻訳系または生細胞系中でタンパク質合成を行わせることからなる、C末端がラベル化されたタンパク質の製造方法、

（2）コーディング領域が50-3,000アミノ酸残基に対応する長さからなるDNAである1項に記載の方法、（3）ラベル化試薬のラベル部が、蛍光性物質、放射性物質、または非放射性標識物質である1項に記載の方法、（4）ラベル化試薬のアクセプター部が、核酸または核酸誘導体である1項に記載の方法、（5）核酸誘導体が、核酸とアミノ酸若しくはアミノ酸誘導体とが結合した化合物である4項に記載の方法、（6）ヌクレオチド誘導体が、ビュロマイシンまたはビュロマイシン誘導体である4または5項に記載の方法、（7）無細胞翻訳系が小麦胚芽抽出液またはウサギ網状赤血球抽出液

を使用する1項に記載の方法、に存する。本発明の特徴は、無細胞翻訳系または生細胞系にプロモーター領域の制御下にある、終止コドンが削除されたコーディング領域からなるDNAから転写された産物(加工mRNA)を鋳型として加え、最終濃度15~50μMのビューロマイシンまたはビューロマイシン誘導体などのラベル化試薬の存在下でタンパク質合成を行わせると、翻訳タンパク質のC末端にラベル化物質が効率よく結合し、C末端がラベル化された高分子量のタンパク質が得られることにある。ビューロマイシンにフルオレセイン等の蛍光物質を化学結合させた化合物は、ビューロマイシンと同様、タンパク質のC末端の機能を損なうことなく翻訳タンパク質のC末端に結合するため、放射能物質を使用することなくタンパク質の同定が可能であることがわかった。すなわち、無細胞翻訳系に蛍光化ビューロマイシン等のラベル化試薬を加え反応後、その反応生成物を電気泳動し、ゲルをそのまま蛍光イメージアナライザーで読み取ることにより、容易に翻訳タンパク質を同定できる。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明のタンパク質のC末端がラベル化されたタンパク質は、加工されたDNAの転写産物(加工mRNA)を無細胞翻訳系または生細胞系に鋳型として加え、標識物質よりなるラベル部と、タンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物よりなるアクセプター部とから構成されるラベル化試薬の存在下でタンパク質合成を行わせることによって製造される。

【0006】プロモーター領域の制御下にある、終止コドンが削除されたコーディング領域からなるDNAから転写された産物(加工されたmRNA)は、プロモーター領域と、終止コドンが削除されたコーディング領域とからなるDNAからRNAポリメラーゼを用いて転写することによって得られる。コーディング領域の長さは、50-3,000アミノ酸残基に対応する長さのDNAであるのが好ましい。すなわち、本発明の方法によれば、高分子量のタンパク質であっても効率よくそのC末端をラベル化できるので、ゲノム解析で得られるタンパク質の同定やその機能解析にきわめて有用である。

【0007】本発明の方法では、ラベル化試薬によりタンパク質のC末端がラベル化される。ラベル化試薬は、ラベル部とアクセプター部とから構成される。ラベル部は、通常、蛍光性物質、放射性物質および非放射性標識物質から選択される。ラベル部の蛍光物質としては、フルオレセイン系列以外にも、フリーの官能基(例えばカルボキシル基、水酸基、アミノ基など)をもち、スベーターを介してビューロマイシンまたはビューロマイシン様化合物などのヌクレオチド誘導体に連結可能な種々の蛍光色素(例えば、ローダミン系列、エオシン系列、NB D系列など)であれば如何なるものであってもよい。

【0008】その他、ラベル部としては、³²P、³³P、³⁵Sのような放射性標識物質、ビオチンのような補酵素、

タンパク質、ペプチド、糖類、脂質類、色素、ポリエチレングリコールなどの非放射性標識物質、あるいはラベル化可能な化合物であれば、その化合物の種類、大きさを問わない。

【0009】ラベル化試薬を構成する別の成分であるアクセプター部としては、通常、核酸または核酸誘導体を使用される。核酸誘導体としては、核酸とアミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質が化学的に結合した化合物を用いることができる。代表的な化合物として、アミド結合を有するビューロマイシン(Puromycin)、3'-N-アミノアシルビューロマイシンアミノヌクレオシド(3'-N-Aminoacylpuromycin aminonucleoside、PANS-アミノ酸)、たとえば、アミノ酸部がグリシンのPANS-Gly、バリンのPANS-Val、アラニンのPANS-Ala、その他、全アミノ酸に対応するPANS-全アミノ酸化合物が挙げられる。また、化学結合として3'-アミノアデノシンのアミノ基とアミノ酸のカルボキシル基が脱水縮合した結果形成されたアミド結合でつながった3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシド(3'-Aminoacyladenine aminonucleoside、AANS-アミノ酸)、たとえば、アミノ酸部がグリシンのAANS-Gly、バリンのAANS-Val、アラニンのAANS-Ala、その他、全アミノ酸に対応するAANS-全アミノ酸化合物が利用できる。また、ヌクレオシドあるいはヌクレオチドとアミノ酸のエステル結合したものなども利用できる。その他、核酸あるいは核酸に類似した化学構造骨格および塩基を有する物質と、アミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質とを化学的に結合可能であれば、そのようにして結合した化合物は、すべて使用できる。

【0010】上記したビューロマイシン(第1図のIの化合物)は細菌(Nathans, D. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 51, 585-592; Takeda, Y. et al. (1960) J. Biochem. 48, 169-177) および動物細胞(Ferguson, J. J. (1962) Biochim. Biophys. Acta 57, 616-617; Nemeth, A. M. & de la Haba, G. L. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1190-1193)のタンパク質合成を阻害することが知られている。ビューロマイシンの構造はアミノアシルtRNAの構造と類似しているため、リボソーム上のAサイトに入り、Pサイトに存在しているペプチジルtRNAと反応し、ペプチジルビューロマイシンとしてリボソームから遊離する(Harris, R. J. (1971) Biochim. Biophys. Acta 240, 244-262)。

【0011】タンパク質合成系において、終止コドンをもたない切断されたmRNAを鋳型に用いた場合、タンパク質合成が停止することが知られている。このように、mRNAに対応するコドンがない場合は、アミノアシル-tRNAや終止因子はリボソーム上のAサイトに入ってもペプチド転移反応で触媒されない。一方、このような状態でもビューロマイシンや本発明の誘導体は、リボソーム上のAサイトでリボソームのペプチド転移反応により触媒さ

れ、タンパク質のC末端に効率よく結合できることがわかった。

【0012】これを確かめるには、終止コドンをもつmRNAと終止コドンをもたないmRNAを作成し、蛍光性のビューロマイシン誘導体、たとえばフルオレセニルビューロマイシン (Fluorpur) (図1のIIの化合物) と共に無細胞翻訳系に加え、タンパク質のC末端の蛍光ラベル化の効率を調べる必要がある。

【0013】タンパク質としては標準的な分子量をもつβ-ラクタマーゼ (分子量 32 kDa) の終止コドンのないものと、あるもののmRNAを調製するために、図2に示したような5'側からT7プロモーター、Kozak配列 (コザック配列)、β-ラクタマーゼのコーディング領域、それと終止コドンのないもの(A)とあるもの(B)の遺伝子DNAを作成した。

【0014】蛍光性のビューロマイシン誘導体としては、ラベル部としてフルオレセイン、アクセプター部としてビューロマイシンを選び、両者を化学結合で連結した蛍光性のラベル化化合物、例えばFluorpur(第1図のIの化合物)を化学合成した。

【0015】真核生物の無細胞転写翻訳系、例えばウサギ網状赤血球抽出液 (Nuclease treated Rabbit reticulocyte lysate) や小麦胚芽抽出液の翻訳系において、上記のT7プロモーター、Kozak配列、β-ラクタマーゼのコーディング領域、それと終止コドンのないものとあるもののDNAからの転写産物 (加工mRNA) を鋳型として加え、Fluorpur存在下でタンパク質合成を行わせ、タンパク質の蛍光ラベル化について調べると、β-ラクタマーゼの全長タンパク質のC末端にFluorpurが、16μMの濃度で明確に結合していることがわかった (図3A)。Fluorpurによるβ-ラクタマーゼの全長タンパク質の蛍光ラベル化は、大腸菌の無細胞転写翻訳系でも確認された。特に、小麦胚芽抽出液の無細胞翻訳系を用いた場合、終止コドンのないmRNAの方 (図3のレーン1) が終止コドンのあるmRNA (図3のレーン3) に比べ、10倍程度ラベル化効率が増大することが確認された。

【0016】

【実施例】以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、下記の実施例は本発明についての具体的な認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものでない。

【0017】実施例1

真核細胞の無細胞翻訳系 (小麦胚芽抽出液、ウサギ網状赤血球抽出液) を使ったβ-ラクタマーゼのC末端蛍光ラベル化

<1>転写用DNAの構築とmRNAの作成

材料: β-ラクタマーゼ遺伝子の載ったpBR322プラスミド (Sutcliffe, J. G. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3737-3741) は、石坂正道氏 (九州大学、三菱化学生命科学研究所) より供与された。E.coli pARベクター

(Rosenberg, A.H. et al. (1987) Gene 56, 125-135) のT7プロモーターとKozak共通配列を含むDNAは日本製粉

(株) で合成された。PCR用DNAプライマーはエスベックオリゴサービス、DNA/RNAプライマーは日本ジェンセットによってそれぞれ合成された。各種酵素、試薬等は市販のものを用いた: RNA分解酵素Ribonuclease A (シグマ); 核酸修飾酵素 T4 DNA Polynucleotide Kinase (NEB), T4 DNA ligase (NEB); 耐熱性DNA合成酵素 G old Taq. Polymerase (Perkin-Elmer); RNA合成酵素キット Ribomax Large Scale RNA Production System (Promega); キャップアナログ RNA capping Analog (Gibco BRL); 無細胞翻訳系キット: ウサギ網状赤血球抽出液 (Rabbit Reticulocyte Lysate Systems, Nuclease Treated, Promega), 小麦胚芽抽出液 (Wheat Germ Extract, Promega); 電気泳動試薬 アクリルアミド、アクリルアミドドービス、SDS、等はすべてナカライテスク製。プライマー除去剤Primer Remover はEdgeより購入した。

【0018】方法: 転写効率の高い大腸菌ウイルスT7のRNAポリメラーゼによって認識されるDNA配列 (T7プロモーター配列) と翻訳の際に真核細胞のリボソームによって認識されやすい配列 (Kozak コンセンサス配列) をもったDNA (図2) を次のようにして構築した。まず、上記の配列をもつ領域とβ-ラクタマーゼ遺伝子をもつ領域を独立に作成する。T7プロモーター配列とKozakコンセンサス配列を含む1本鎖DNA (配列番号1) を化学合成し、DNAプライマー (配列番号2) とDNA/RNAプライマー (配列番号3) によってPCRを行う。一方、β-ラクタマーゼ遺伝子の載ったpBR322プラスミドを鋳型としてDNA/RNAプライマー (配列番号4) とDNAプライマー (配列番号5) でPCRすることにより、β-ラクタマーゼ遺伝子DNA領域を増幅する。これらをRRR法 (Nishigaki, K. et al. (1995) Chem. Lett. 131-132) に従って、それぞれのPCR反応液にリボヌクレアーゼ Aを加え、60℃で30分反応させることにより、DNA/RNAプライマー (配列番号3と配列番号4) のRNAの3'側のリン酸ジエステル結合を切断して突出末端を作る。これらをフェノール抽出後、プライマー・リムーバー (Primer Remover) によってプライマーおよび切断されたDNA断片を除去しエタノール沈殿させる。乾燥後、T4 DNA リガーゼ用バッファーに溶解しT4 DNA ポリヌクレオチド・キナーゼ (Polynucleotide Kinase) を加えて45℃、30分反応後、さらに30分かけて徐々に16℃に温度を下げてからT4 DNA リガーゼを加え、上述の2つのDNA領域を結合させた。この反応液の一部を採取し、DNAプライマー (配列番号2および配列番号5) を使って再度、PCRで増幅し、転写用に図2の(A)を作成した。

【0019】一方、終止コドンをもつβ-ラクタマーゼ遺伝子からなる転写用DNA (図2のB) は、上記の方法においてDNAプライマー (配列番号5) の代わりに別のDNA

プライマー（配列番号6）を用いることにより作成した。上記の方法で作成した2つのDNAは、RNA合成キット Ribomax Large Scale RNAProduction System (Promega)を使って転写した。合成効率を上げるためにキャップアナログ RNA capping Analog (Gibco BRL)を使い、mRNAの5'側を修飾した。キャップアナログおよび過剰のNTPを除去するためにプライマー・リムーバーを使ってエタノール沈殿を行なった。

【0020】<2>蛍光ラベル化試薬Fluorpurの調製
材料：ビューロマイシン（puromycin）はシグマから、フルオレダイト（6-N-carboxy-di-O-pivaloyl-fluorescein-hexyl-O-(2-cyanoethyl)-(N,N'-diisopropyl)-phosphoramidite）は日本パーセプティブから、テトラゾールは日本ミリポアから、クロマト用シリカゲルはメルクからそれぞれ購入した。

【0021】方法：ビューロマイシン（26 mg, 48 μ mol）を3 mlの乾燥ピリジンに溶かし、減圧下で蒸発させ、脱水させる。この操作を3回繰り返す。これに5 mlの4%テトラゾール/アセトニトリル溶液とフルオレダイトを加え、室温で攪拌させる。反応はシリカゲルの薄層クロマトグラフィー（TLC、展開溶媒：クロロフォルム：メタノール=9:1）でモニターする。通常、反応は2時間で終了する。反応後、溶媒を減圧下で追い出し、これに0.1 Mのヨウ素をテトラヒドロフラン/ピリジン/水=80:40:2に溶かした溶液 2 mlを加え、室温で攪拌させながら生成したホスファイト-トリエステルを酸化させる。1時間半後、溶媒を減圧下で除去し、残部をクロロフォルムで抽出する。抽出液は無水硫酸マグネシウム存在下で乾燥させた後、減圧下で溶媒を除去する。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、クロロフォルム/メタノール=90:10で溶出させる。保護基のついたFluorpurはシリカゲルTLC（展開溶媒：クロロフォルム：メタノール=9:1）でRf 0.26のところ溶出される。次に保護基の脱保護を行う。保護基のついたFluorpurを濃アンモニア水/エタノール=2:1の混合溶液 1 mlに加え、 β -シアノエチル基を除去するとFluorpur（図1のII）が7mg得られる。合成品がFluorpurであることは、そのpH 9の溶液の紫外可視吸収スペクトルが272 nm（ビューロマイシン部由来）と494 nm（フルオレセイン部由来）に現われることと、MALDI/TOFマスマスペクトロメトリーで[M+H]⁺の分子イオンがm/z 1010に現われることから同定された。

【0022】<3>タンパク質の蛍光ラベル化
作成したmRNAは、（1）ウサギ網状赤血球無細胞翻訳系 Rabbit Reticulocyte Lysate Systems, Nuclease Treated (Promega)および（2）小麦胚芽無細胞翻訳系 Wheat Germ Extract (Promega)の2種類の翻訳系においてFluorpurの最終濃度が16 μ Mになるように加え、それぞれの至*

*適反応温度（ウサギ網状赤血球無細胞翻訳系：30℃、小麦胚芽無細胞翻訳系：25℃）で60分反応させた。

【0023】<4>タンパク質のラベル化の確認

フルオレセニルビューロマイシン（Fluorpur）でラベル化されたタンパク質の確認は、上記の無細胞翻訳産物をサンプルとしてSDS-PAGEで20V定電圧、90分泳動したゲルを蛍光イメージング装置（FluorImager 595, Molecular Dynamics）で直接読み取ることにより行った。最も効率よく蛍光ラベルされた全長 β -ラクターゼ（分子量 32 kDa）は、小麦胚芽系無細胞翻訳系を用い、終止コドンのないDNA（図2のA）から転写したmRNAを使って、Fluorpurが最終濃度16 μ Mになるように加えた場合に得られた（図3Aのレーン1）。しかし、同じ小麦胚芽系無細胞翻訳系を用いて、Fluorpurが最終濃度16 μ Mであっても終止コドンのあるDNA（図2のB）から転写したmRNAを使用した場合には、その蛍光ラベル化の効率は終止コドンのないDNAの場合に比べ10分の1以下であった（図3Bのレーン3）。また、ウサギ網状赤血球の無細胞翻訳系においても、終止コドンのないDNAから転写したmRNAを使って翻訳させた系（図3Aのレーン5）では、終止コドンのあるDNAから転写したmRNAを使った場合（図3Aのレーン6）に比べ3～4倍ラベル化効率が上昇した。比較のため、従来のタンパク質の蛍光染色法（SYPRO Orange）で同じゲルを染色したものが図3Bに示してある。SYPRO Orangeで染色した場合、投入したmRNAによって翻訳されたタンパク質（ β -ラクターゼ）は、無細胞翻訳系由来のタンパク質の中に埋もれて確認することができなかった。以上のことから、本発明の方法によるタンパク質のラベル化がSDS-PAGEによる合成タンパク質の同定において有効であることが確認された。

【0024】

【発明の効果】本発明により、原核細胞と真核細胞とを問わず無細胞翻訳系および生細胞を利用して翻訳合成されたタンパク質のC末端を効率よく蛍光等によりラベル化することが可能になった。本発明は、遺伝子から発現されるタンパク質の同定と、それらの相互作用などの機能解析をより迅速に、安全かつ経済的に実施することを可能にする。その他、本発明の方法で得られるC末端がラベル化されたタンパク質は、該タンパク質と結合するかあるいは相互作用し、その活性を阻害または活性化する化合物の同定にも有用である。すなわち、本発明の方法で得られるC末端がラベル化されたタンパク質を、スクリーニングしようとする化合物と結合しない相互作用した結果、残存または消失する該タンパク質のC末端ラベルを検出する等の方法により該化合物をも同定できる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Chemical Corporation

<120> A process for the production of C-terminal labelled
protein

<130>

<140>

10

<141> 1988-11-

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 88

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 1

30

gatcccgca aattaatacg actcactata gggagaccac aacggtttcc ctctagaaat 60

aattttgttt aactttaaga aggaqatg

88

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 2

gatcccgca aattaatacg actcactata ggg

33

50

11
<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA
10

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)

<223> n is ribocytidylic acid.

<400> 3
20
ggaagcatg gtggcatctc cttcttaa

29

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
30
<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<221> misc_feature

<222> (6)

<223> n is ribocytidylic acid.
40
<400> 4

gcttcnaaac aaagcactat tgactggc 29

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 5

ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc a

31

10

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 6

ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg ag

32

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1-6: 合成 DNA

【図面の簡単な説明】

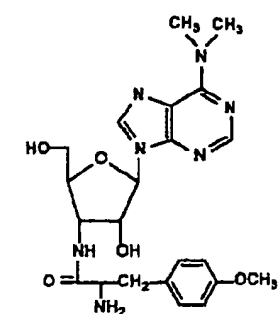
【図 1】 ビューロマイシンおよびその誘導体の化学構造。Iはビューロマイシン (puromycin)、IIはフルオレセニルビューロマイシン (Fluorpur)である。

【図 2】 β -ラクタマーゼの遺伝子 DNA の構築図。Aは終 *

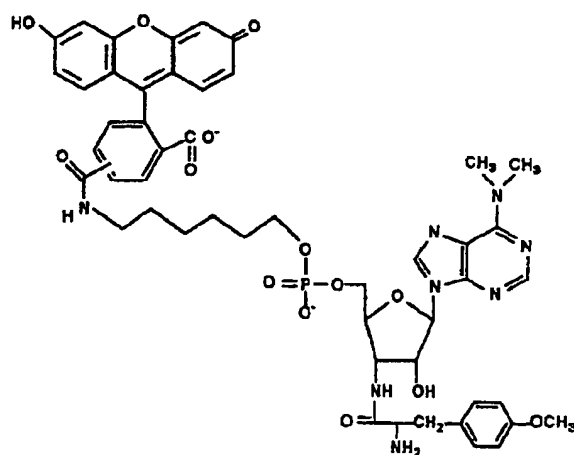
* 止コドンのない遺伝子 DNA、Bは終止コドンのある遺伝子 DNA である。

【図 3】 β -ラクタマーゼの C 末端への Fluorpur の結合を示すポリアクリルアミドゲル電気泳動写真 (A) とそれを SYPRO Orange で蛍光染色したポリアクリルアミドゲル電気泳動写真 (B)。

【図 1】



ビューロマイシン (puromycin, I)



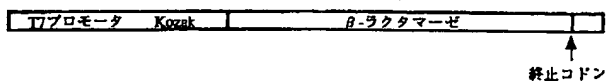
フルオレセニルビューロマイシン (Fluorpur, II)

【図2】

(A)

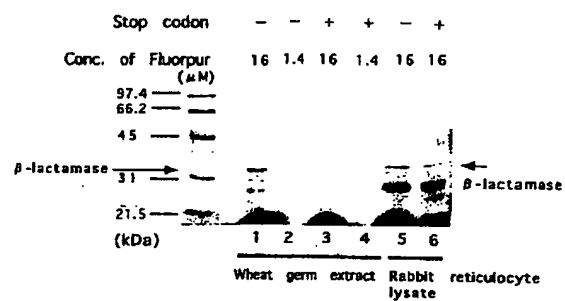


(B)

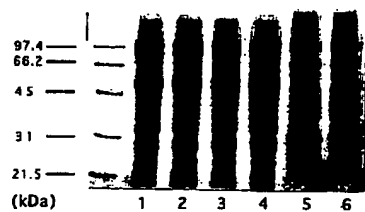


【図3】

(A)



(B)



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA80 CA01 CA02
 CA04 CA11 CA12 CA20 DA01
 DA02 DA05 DA11 GA11 GA17
 GA18 GA19
 4B064 AG01 CA01 CA19 CA50 CC01
 CC24 CD30 CE14 DA13
 4H045 AA20 BA54 BA70 BA71 EA50
 EA65 FA74

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.